

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-066802

(43)Date of publication of application : 11.03.1994

(51)Int.Cl. G01N 33/543
G01N 21/64

(21)Application number : 05-006057 (71)Applicant : UNIV MARYLAND AT BALTIMORE
(22)Date of filing : 18.01.1993 (72)Inventor : LAKOWICZ JOSEPH R
MALIWAL BADRI P
THOMPSON RICHARD
OZINSKAS ALVYDAS

(30)Priority

Priority number : 92 822233 Priority date : 17.01.1992 Priority country : US

(54) FLUORESCENT ENERGY TRANSFER IMMUNOASSAY

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for performing immunoassay utilizing transfer of photoluminescence energy.

CONSTITUTION: In the immunoassay utilizing photoluminescence, one of first or second immunoreactive substance is labeled with a donor of photoluminescence energy transfer while the other substance is labeled with a complementary acceptor and at least the donor exhibits photoluminescence. The donor and the acceptor are selected to interact upon occurrence of immunoreaction to cause a detectable variation in the lifetime of luminescence. A sample is prepared by exposing the first immunoreactive substance to the first and second immunoreactive substances and then the sample is excited by irradiation. A resulting emission is detected and the lifetime of apparent luminescence is calculated in order to determine the reaction product of the first and second immunoreactive substances.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 17.01.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3325939

[Date of registration] 05.07.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-66802

(43)公開日 平成6年(1994)3月11日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	D	9217-2 J		
21/64	Z	9115-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数28(全 31 頁)

(21)出願番号 特願平5-6057

(22)出願日 平成5年(1993)1月18日

(31)優先権主張番号 8 2 2 2 3 3

(32)優先日 1992年1月17日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 593010165

ユニバーシティ・オブ・メリーランド・ア
ト・バルティモア

UNIVERSITY OF MARYL
AND AT BALTIMORE

アメリカ合衆国21201-1627メリーランド
州バルティモア、ウエスト・ロンバード・
ストリート520番

(72)発明者 ジョセフ・アール・ラコウィッツ

アメリカ合衆国21045メリーランド州コロ
ンビア、エマーソンズ・リーチ9142番

(74)代理人 弁理士 青山 蓀 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 蛍光エネルギー移転イムノアッセイ

(57)【要約】

【目的】 光ルミネセンスエネルギーの移転を利用して
イムノアッセイを行う方法を提供する。

【構成】 免疫反応の第一および第二反応体の一方が光
ルミネセンスのエネルギー移転のドナーでラベルされて
おり、他方がこれと相補的なアクセプターでラベルされ
ており、少なくとも該ドナーは光ルミネセンス性を有
し、ドナーおよびアクセプターが免疫反応が生じたとき
に、相互作用して検出可能なルミネセンスの寿命の変化
を生ずるように選択されているものである、免疫反応の
第一反応体を該第一反応体と反応する第二反応体に暴露
することによって試料を調製し；この試料を照射により
励起させ；その結果の発光を検出し；みかけのルミネセ
ンスの寿命を免疫反応の第一および第二反応体による反
応生成物の存在量を定量するために計算することからな
る、光ルミネセンスを利用したイムノアッセイ法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫反応の第一および第二反応体の一方が光ルミネセンスのエネルギー移転のドナーでラベルされており、他方が該ドナーと相補的な光ルミネセンスのエネルギー移転のアクセプターでラベルされており、該ドナーが光ルミネセンス性を有し、この光ルミネセンス性ドナーおよびアクセプターが免疫反応の第一反応体が免疫反応の第二反応体と反応したときに、ドナーとアクセプターが相互作用して検出可能なルミネセンスの寿命の変化を生ずるように選択されているものである、免疫反応の第一反応体を該第一反応体と反応する第二反応体に暴露することによって試料を調製し；試料を照射により励起させ；その結果の発光を検出し；みかけのルミネセンスの寿命を免疫反応の第一および第二反応体による反応生成物の存在量を定量するために計算する；ことからなる、光ルミネセンスを利用したイムノアッセイ法。

【請求項2】 光ルミネセンスのドナーが、シアニン類、オキサジン類、チアジン類、ポルフィリン類、フタロシアニン類、蛍光赤外線発光多核芳香族炭化水素類、フィコビリタンパク質類、スルホニルクロライド類、カルボジイミド類、ハロアセチル誘導体類、スククアライン類および有機-金属錯体類からなる群から選択される請求項1記載の方法。

【請求項3】 光ルミネセンスのアクセプターがシアニ

ン類、オキサジン類、チアジン類、ポルフィリン類、フタロシアニン類、多核芳香族炭化水素類、フィコビリタンパク質類、スクアライン類、有機-金属錯体、カルボジイミド類、スルホニルクロライド類、ハロアセチル類およびアゾ色素類からなる群から選択される請求項1記載の方法。

【請求項4】 免疫反応の第一反応体が免疫反応の第二反応体と反応した時にドナーとアクセプター間にエネルギーの移転が生じる請求項1記載の方法。

【請求項5】 みかけの寿命を位相変調蛍光定量法を用いて計算する請求項1記載の方法。

【請求項6】 みかけの寿命を時間分解蛍光定量法を用いて計算する請求項1記載の方法。

【請求項7】 免疫反応の第一および第二反応体が拮抗アッセイに関するものである請求項1記載の方法。

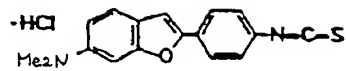
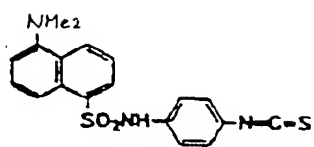
【請求項8】 免疫反応の第一および第二反応体が非拮抗アッセイに関するものである請求項1記載の方法。

【請求項9】 免疫反応の第一および第二反応体がサンドイッチアッセイに関するものである請求項1記載の方法。

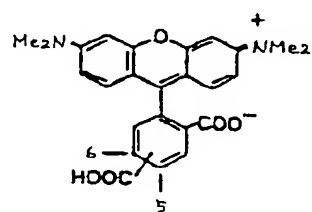
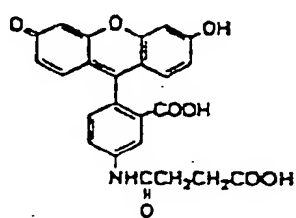
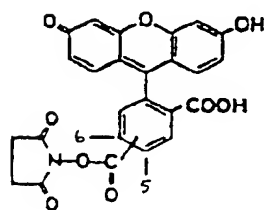
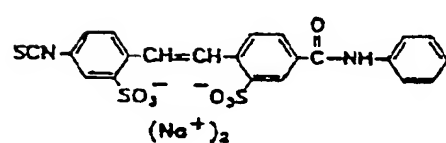
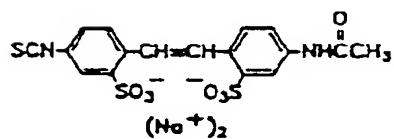
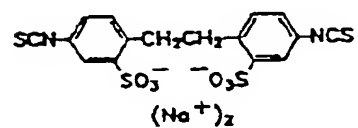
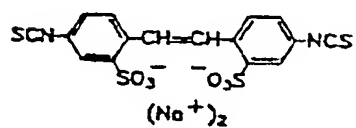
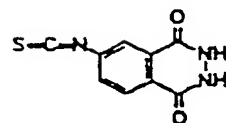
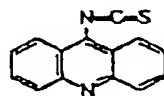
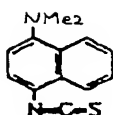
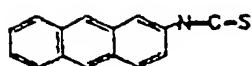
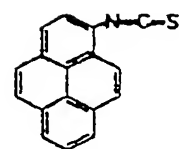
【請求項10】 光ルミネセンスのドナーが、フルオレセインイソチオシアネート、ジクロロトリアジニルアミノフルオレセイン、1, 3-ビス-(2-ジアルキルアミノ-5-チオニル)置換スクアライン類、

【化1】

3



4



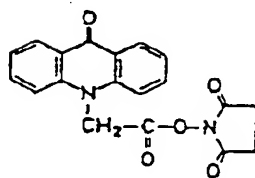
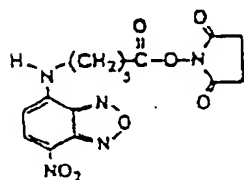
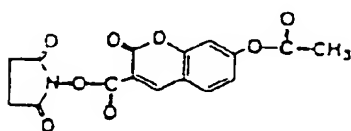
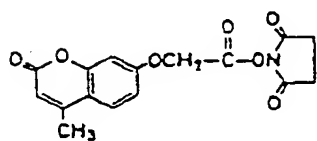
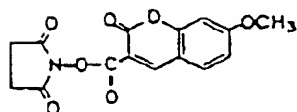
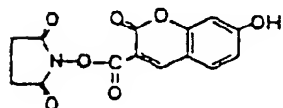
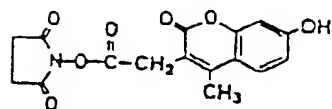
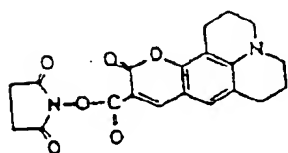
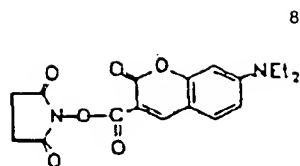
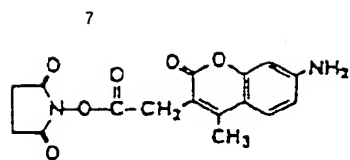
【化2】

40



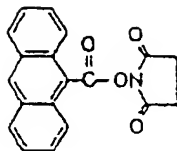
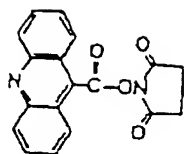
(5)

特開平 6-66802

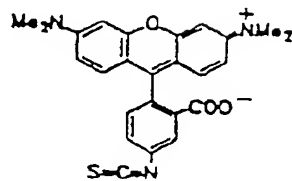
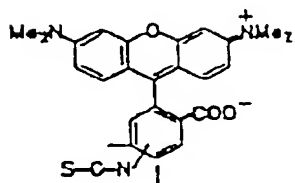
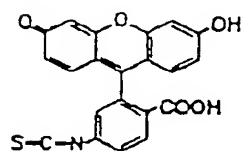
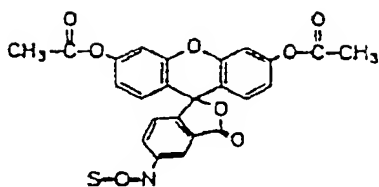
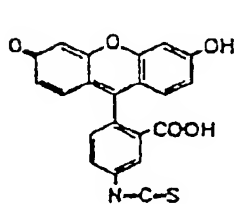
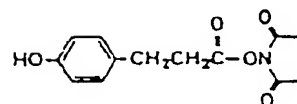
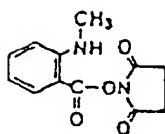
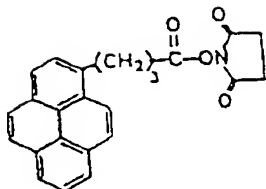
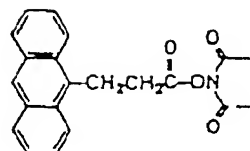


【化4】

9

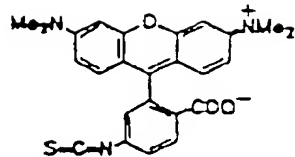


10

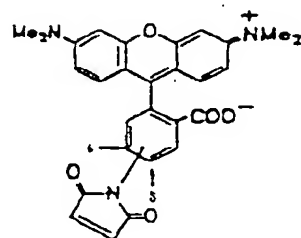
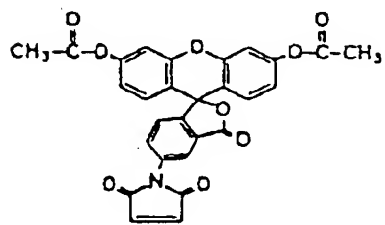
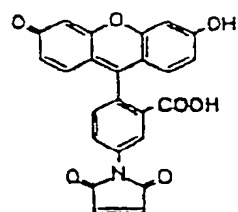
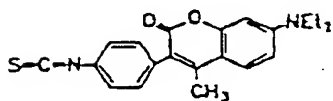
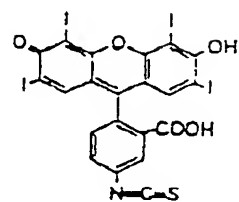
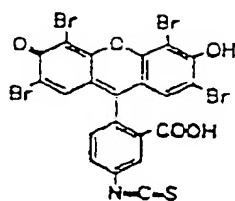
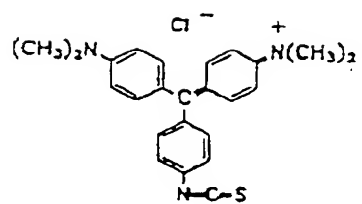
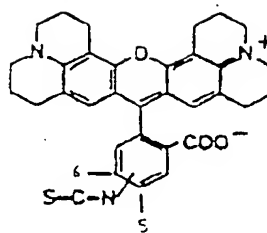


【化5】

11

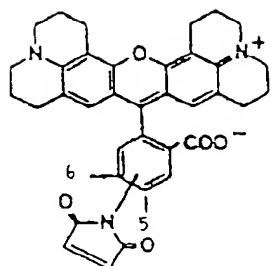


12

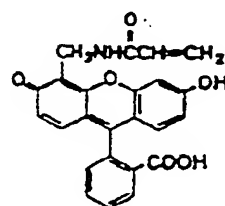
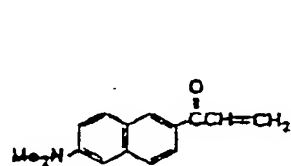
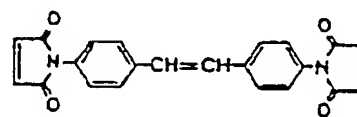
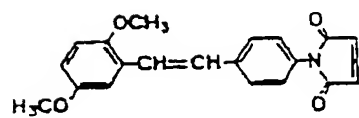
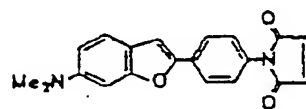
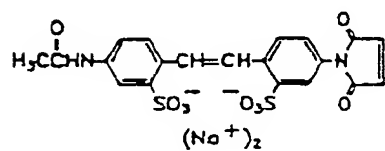
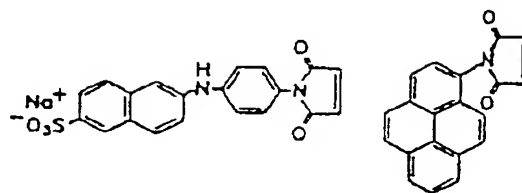
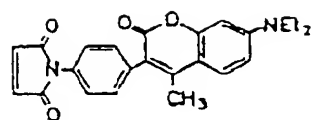
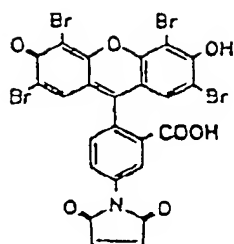


【化6】

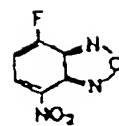
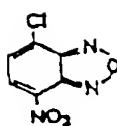
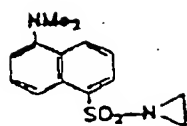
13



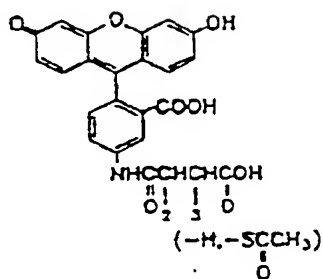
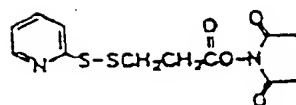
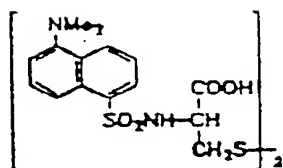
14



15



16

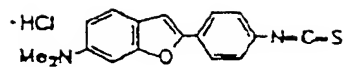
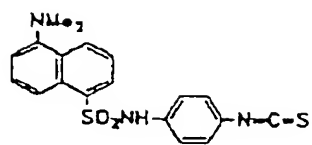


からなる群から選択される、請求項 2 記載の方法。

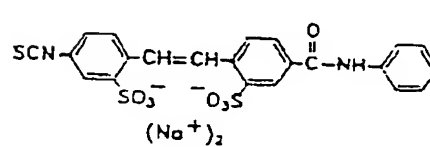
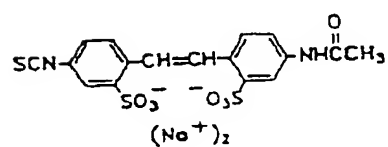
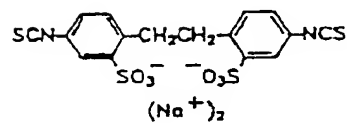
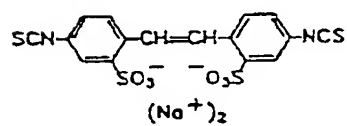
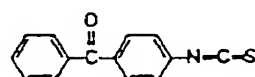
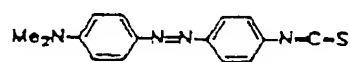
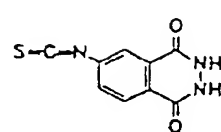
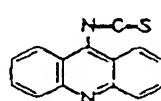
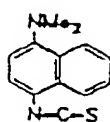
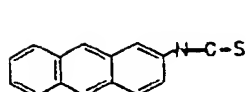
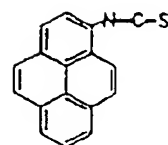
【請求項 11】 光ルミネセンスのアクセプターが、エ
オシンイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイ

30 ソチオシアネート、1, 3-ビス-(2-ジアルキルア
ミノ-5-チオニル)-置換スクアライン類、
【化 8】

17

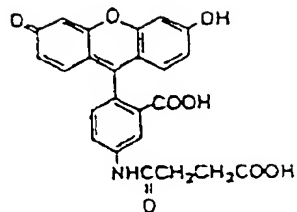
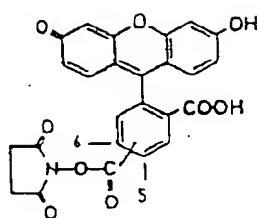


18

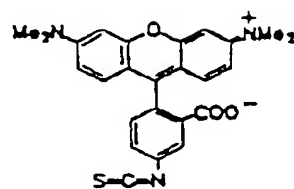
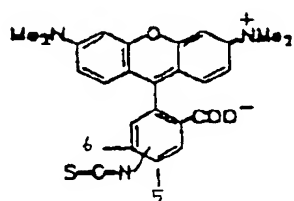
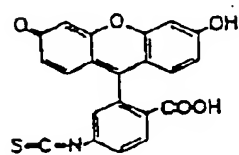
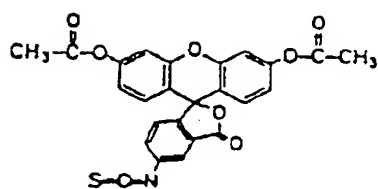
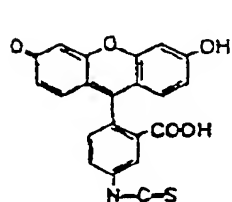
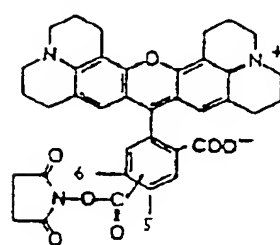
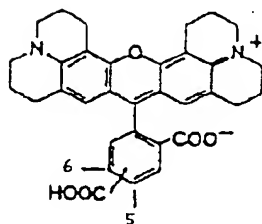
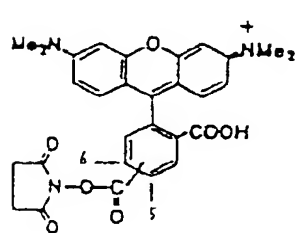
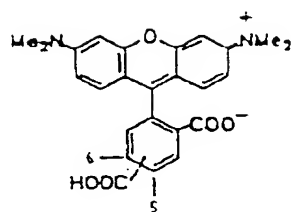


【化 9】

19

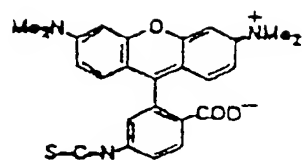


20

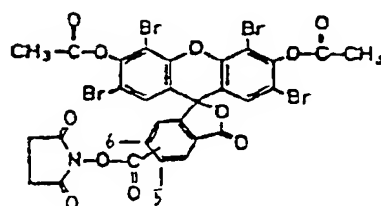
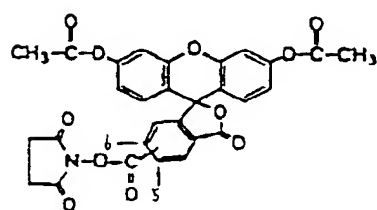
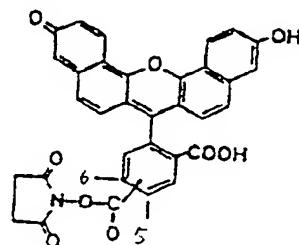
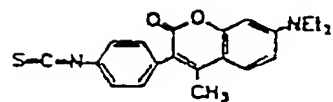
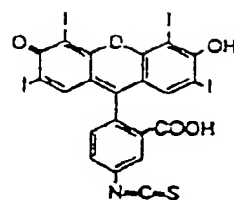
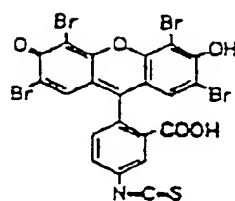
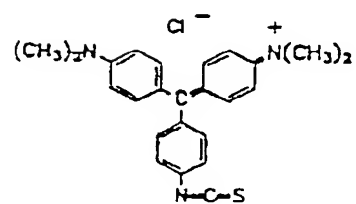
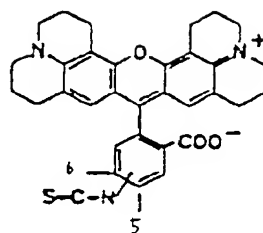


【化10】

21

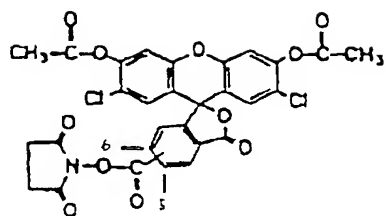


22

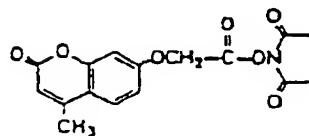
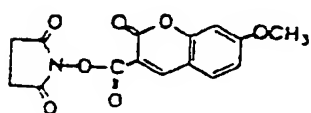
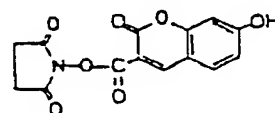
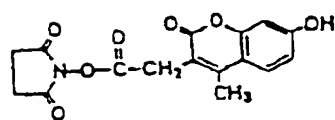
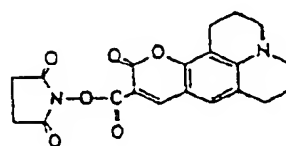
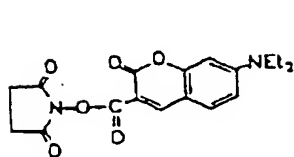
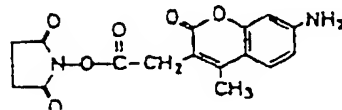
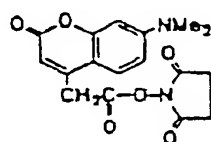
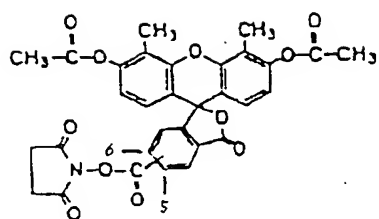


【化11】

23

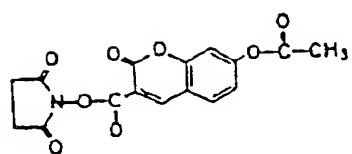


24

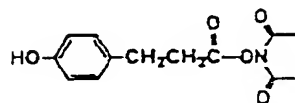
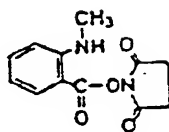
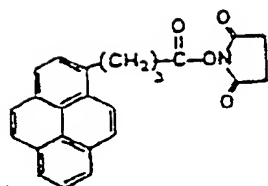
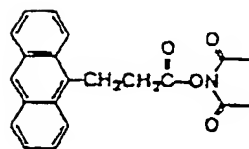
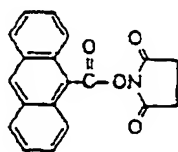
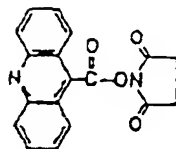
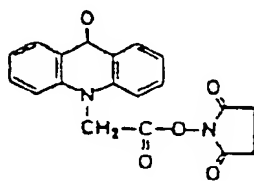
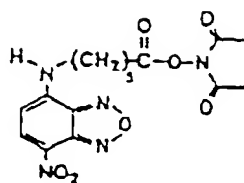


【化 12】

25



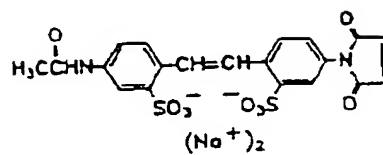
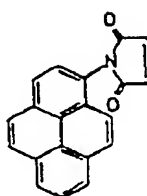
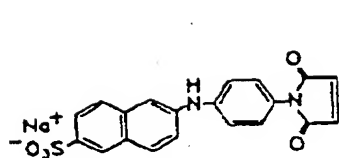
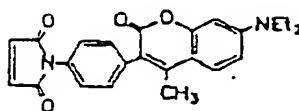
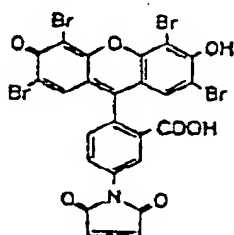
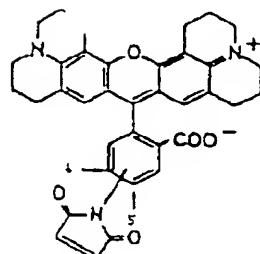
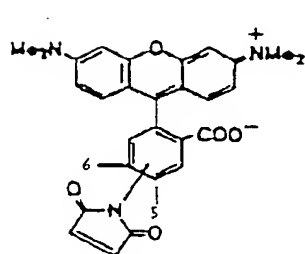
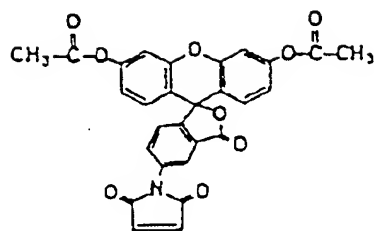
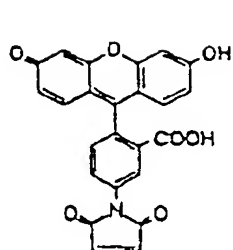
26



【化 13】

27

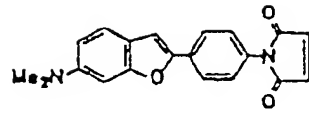
28



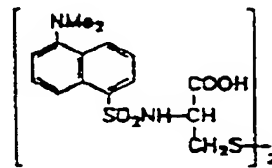
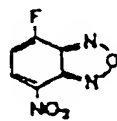
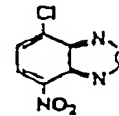
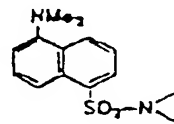
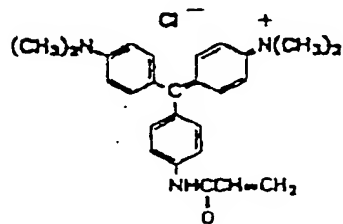
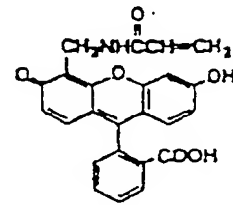
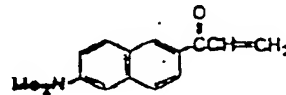
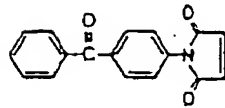
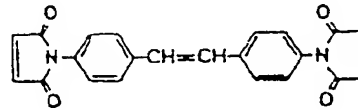
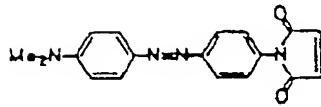
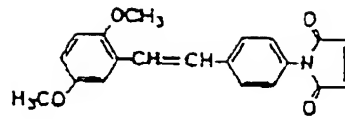
【化14】

40

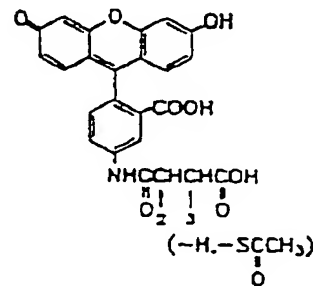
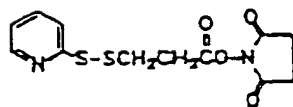
29



30



【化15】



からなる群から選択される請求項3記載の方法。

【請求項12】 免疫反応の第一および第二の反応体による免疫反応生成物の量を、みかけの光ルミネセンスの寿命に基づいて定量するステップをさらに有する請求項

50

1記載の方法。

【請求項13】 試料をイン・ビトロで調製する請求項1記載の方法。

【請求項14】 試料をイン・ビボで調製する請求項1

記載の方法。

【請求項15】 試料をイン・サイチュで調製する請求項1記載の方法。

【請求項16】 試料を変調光あるいはパルス光で励起する請求項1記載の方法。

【請求項17】 試料を正弦波型に変調した光あるいはスクエア波光にて励起する請求項1記載の方法。

【請求項18】 試料をヘリウム・カドミウムレーザーを用いて励起する請求項1記載の方法。

【請求項19】 試料をチタン・サファイアレーザー、レーザーダイオードあるいは色素レーザーと同調ポンピングする連続波周波数2倍モード固定アルゴンイオンあるいはNd:YAGレーザーによって励起する請求項1記載の方法。

【請求項20】 試料を442nmの波長で励起する請求項18記載の方法。

【請求項21】 試料を380nmの波長で励起する請求項19記載の方法。

【請求項22】 ドナーの寿命を計算する請求項1記載の方法。

【請求項23】 アクセプターの寿命を計算する請求項1記載の方法。

【請求項24】 ドナーが約0.1ナノ秒から1ナノ秒の寿命を有する請求項1記載の方法。

【請求項25】 寿命が約5ナノ秒である請求項22記載の方法。

【請求項26】 位相角の差が約45度である請求項5記載の方法。

【請求項27】 試料をHeNeレーザーあるいはレーザーダイオードで励起する請求項1記載の方法。

【請求項28】 ドナーあるいはアクセプターが5-6-カルボキシフルオレセイン; 5-6-カルボキシテトラメチルローダミン; および7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸のスクシンイミジルエステルからなる群から選択される請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、光学的イムノアッセイ方法に、より詳しくは免疫反応の反応体が別個に光ルミネセンスエネルギーの移転のドナーおよびアクセプターによってラベルされているイムノアッセイ方法に関する。免疫反応が起こり、ドナーとアクセプターが互いにきわめて近接した場合に生じるエネルギーの移転が、検出可能なルミネセンス寿命の変化を生じる。

【0002】

【従来の技術】イムノアッセイは、可視的および放射活性計測を含む数多くの手法によって行われている。また、蛍光強度測定を用いることによって免疫反応を光学的に評価することができることも知られている。蛍光強度測定はその簡単さによって望ましいものであるが、この手法の有

効性は、ノイズ、ドリフトなどによる光源の変動、蛍光団褪色およびバックグラウンドの蛍光のような問題によって制限されている。さらに、媒体が濁っていたり着色していたりすれば、蛍光強度の測定値は大きく影響されるであろう。そのうえ、強度は各段階における蛍光団の合計、活性化強度、活性化および放射光の波長幅、検出器の波長感受性などのような多数の要因を直線回帰したものである。複雑なキャリブレーションカーブがこれらの要因を補正するのに必要である。そして最後に、プローブの強度の変化はかならずしも抗原と抗体の反応による必要はない。このように蛍光強度測定は、有用で高い感受性のある環境では有するが、上記にその概要を示した問題による用途の制限に苦しめられている。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明は、光ルミネセンスエネルギー移転のドナーまたはアクセプターの、みかけのルミネセンス寿命の変化をある免疫反応生成物と関連させる方法を提供する。本明細書においては、免疫反応とは、ある抗原が少なくともひとつの、それを認識している抗体と特異的に非共有結合で結合した結合がある場合に生じるものとする。光ルミネセンスのドナーおよびアクセプターは免疫反応の反応体に担われており、免疫反応が生じた場合には、このドナーおよびアクセプターが相互作用することができる、すなわちドナーおよびアクセプター間でのエネルギーの授受が生じ、これが検出可能なルミネセンス寿命の変化となって現れようになっている。寿命を測定することによって、強度測定の場合の問題を排除することができる。見かけ上の寿命は、位相変調蛍光定量法あるいは時間分解蛍光定量法によって測定することができる。本方法の使用により、イムノアッセイはイン・ビボ、イン・ビトロあるいはイン・サイチュで行うことができる。比較的長波長の蛍光でラベルするのが特に有用である。

【0004】

【好ましい具体例の説明】本発明の方法によって、イムノアッセイに用いられる結合反応を計測、定量することができる。本発明の方法においては、免疫反応の反応体をそれぞれ、光ルミネセンスエネルギー移転のドナーおよびアクセプターであって、このうち少なくともドナーが光ルミネセンス性であるものでラベルする。ラベルされた反応体相互の免疫反応によってドナーおよびアクセプターが、反応生成物を照射により励起した場合にドナーとアクセプターの間にエネルギーの移転が生じるほど密接に近接し、このためルミネセンスの寿命の変化を検出できる。異方性、または偏光性あるいは衝突する消光剤に対する感受性の増加あるいは減少もまたエネルギーの移転による寿命の検出に用いられる性質である。反応生成物の合計量および各反応体の濃度あるいは拮抗アッセイにおける拮抗反応体の濃度もまた定量することができる。本発明の方法は様々な、拮抗、非拮抗反応を含

み、単純な抗原抗体反応あるいは様々なサンドイッチ型反応を含む免疫反応に用いることができる。抗原および／または抗体には1以上のドナーあるいはアクセプターまたはラベルを付してもよい。

【0005】「試料」という語は、ここでは広く、免疫反応反応体、例えば抗原および抗体が反応できるようになっているイムノアッセイ系を指す。この言葉には、溶液あるいは懸濁液の状態で第二反応体を作用させるべく、第一反応体が結合されている重合性の支持体のような標準的実験環境のごときものも含まれる。また、液体サンプルおよび／または懸濁液、血液、尿および分泌物を含むようなものも含むことができる。また、本発明の方法では容易なイン・ビボで試験する場合には、患者のことを指す場合もある。

【0006】本発明の方法には、さらに試料を適当な照射源、例えば連続波(CW)レーザー、電気ルミネセンスランプ、アークランプ、光照射ダイオードあるいはレーザーダイオードまたはその類似物のようなものの照射により励起することを含む。光源として、特に本発明の方法に用いるのに有効なのは、緑および赤のヘリウムネオンレーザー、ヘリウムカドミウムレーザー、チタンサファイアレーザー、色素レーザーと同調ポンピングするアルゴンイオンまたはNd:YAGレーザー、および赤および赤外線レーザーダイオードである。

【0007】好ましい具体例のひとつにおいては、励起照射の強度を特定の変調周波数、たとえばシヌソイド型に変調し、寿命を公知の位相変調、すなわち周波数ドメイン法によって定量する。変わりにスクエア波光源のようなパルス波照射を用いてもよく、また寿命を既知の時間分解法で定量してもよい。位相変調および時間分解の両方の蛍光定量方法が従来からよく知られており、ラコウィッツ(Lakowicz)のPrinciples of Fluorescence Spectroscopy (Plenum Press, 1983, 第3章)を参照すればよい。しかしながら現在の機器環境においては位相変調の方がより便利となっている。ラコウィッツのLuminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analyses第141〜177頁(Baeyers, (Keukeleire and Kurkidis 編集)1991年, Maroel-Dekker, Inc.)、バーンドら(Berndt, Gryczynski and Lakowicz)のReviews of Scientific Instrumentation (1990年, 61, 第1816〜1820頁)およびバーンドとラコウィッツのAnalytical Biochemistry (1991年, 印刷中)を参照せよ。簡単にするため、これ以降位相変調方法のみ論ずるが、おなじ原理は一般に、時間分解定量方法にも適応できることは理解されるべきである。

【0008】試料を、その強度が変調、例えばシヌソイド型に変調されている照射によって励起したとき、吸光と発光の間の時間のラグが発光の位相を遅らせ、励起照射に対して復調される。この位相の移転およびそれに伴う復調の要因 m は測定することができ、そして良く知られた式を用いて光ルミネセンスの寿命の計算に用いる

ことができる。ラコウィッツのPrinciples of Fluorescence Spectroscopy上巻参照のこと。本発明では、位相角の差が約45度であることが特に望ましい、というのはこの角度が有意に大きいあるいは小さい場合には精度およびダイナミックレンジが減少するからである。

【0009】本発明においては、エネルギーの移転は光ルミネセンスエネルギー移転のドナーおよび光ルミネセンスエネルギー移転のアクセプターの間で生じ、少なくともこのドナーは光ルミネセンス性である。ドナーとアクセプター間のエネルギーの移転は免疫反応の存在に相関した蛍光の寿命の変化となる。エネルギー移転の効率はドナーから与えられる量、ドナーの発光スペクトルとアクセプターの吸光スペクトルの重なり、およびドナーとアクセプターの間の相対距離と方向に依存する。

【0010】本発明に用いられるドナーは良好な発光量、寿命および消衰係数を有し、衝突による消光および漂白に抵抗性であるべきであり、好ましくは水溶性で、たやすく免疫反応の反応体に抱合されるものである。特に好ましくは、赤および近赤外領域において吸光と発光を示すドナーであり、これらは散乱および背景の蛍光の問題がないため全血および生体組織の分析に有用である。好都合なことに、比較的高価でないため、さほど強力ではないが簡単に変調させることができるレーザーダイオードをこのようなドナーに対する光源として用いることができる。このドナーは好ましくは約0.1ナノ秒から1秒の寿命を有しており、代表的なドナーとしては1から30ナノ秒オーダーの、より好ましくは約5ナノ秒の寿命を有する。短命のドナーは約0.1ナノ秒およびそれ以上、長命のドナーは約30から400ナノ秒であり、そしてランタニド類は1秒までである。

【0011】このようなドナーの例としては、シアニン類、オキサジン類、チアジン類、ポルフィリン類、フタロシアニン類、ビオラントロン類、フィコビリ蛋白質類、マレイミド類、スルスルフヒドリル類、イソチオシアネート類、スクシンイミジルエステル類、カルボイミド類、スルホニルクロリド類、ハロアセチル誘導体等の蛍光赤外発光多核芳香族炭化水素類(fluorescent infrared-emitting polynuclear aromatic hydrocarbons)、例えばDyes and Pigments第17巻第19〜27頁(1991)年に記載されているもの、および米国特許第4,745,076号、同第4,670,572号に記載されたレチニウムおよびランタニド錯体のような有機金属錯体等の近赤外スクアライン色素(near IR squaraine dye)が挙げられる。上記米国特許の記載は本明細書に参考として含まれる。ランタニド錯体は酸素によって消光されないという利点を有し、その長い寿命は生物試料の自己蛍光をたやすく抑制することができるであろう。特に好ましい物質としては、フルオレセインイソチオシアネート(特に、フルオレセイン-5-イソチオシアネート)、ジクロロトリアジニルアミノフルオレセイン、テトラメチルローダニン-5-

35

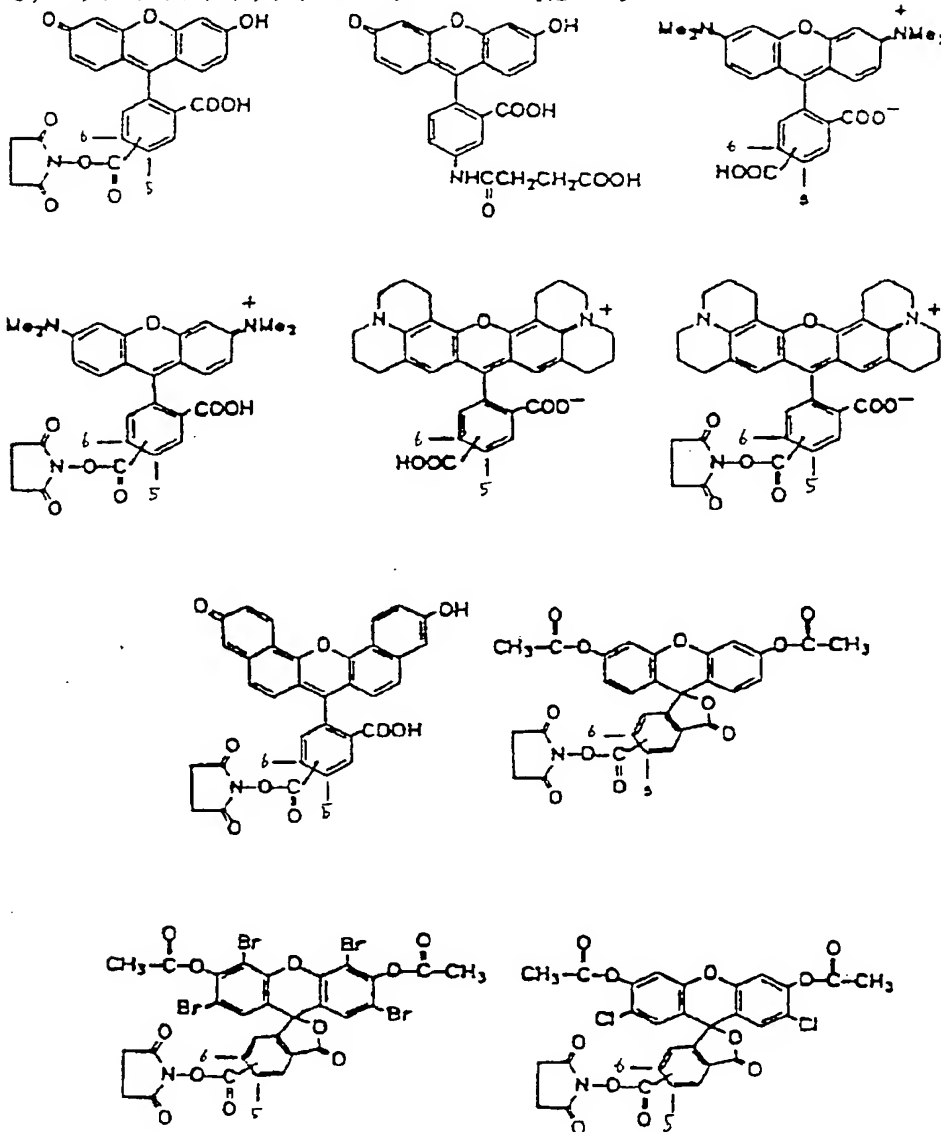
36

(および6-) イソチオシアネート、1, 3-ビス
(2-ジアルキルアミノ-5-チオニル)-置換スクア
ライン類、5 (および6)-カルボキシフルオレセ
ン、5 (および6)-カルボキシテトラメチルローダニ

ン; および7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸
のスクシンイミジルエステル類、

【0012】

【化16】

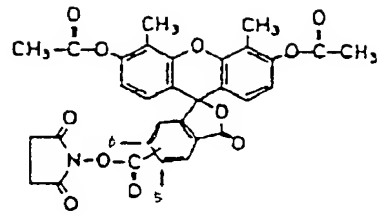


【0013】

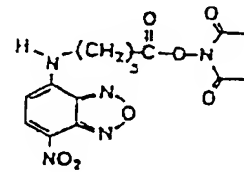
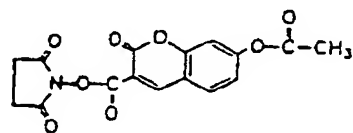
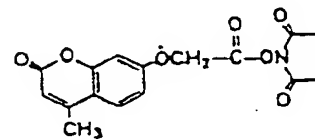
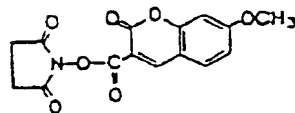
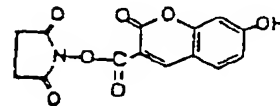
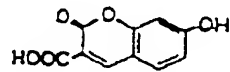
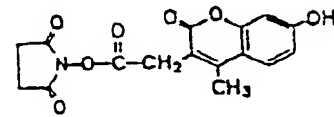
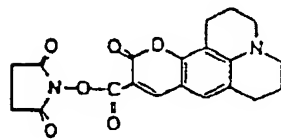
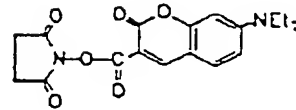
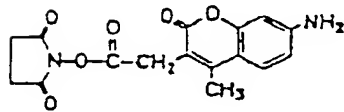
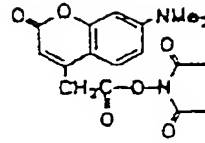
【化17】

40

37



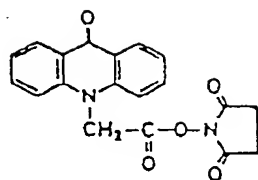
38



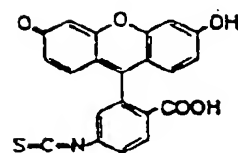
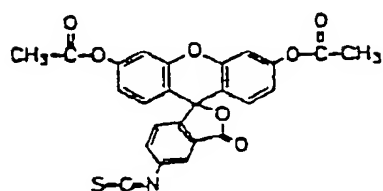
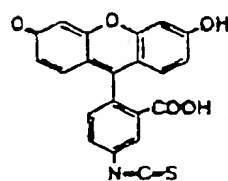
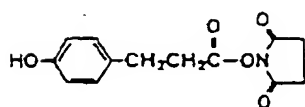
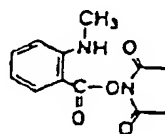
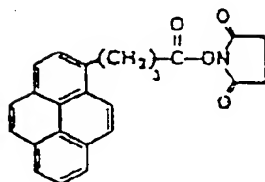
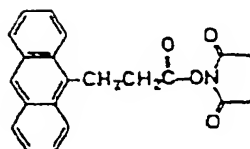
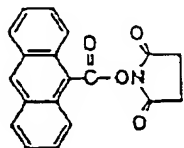
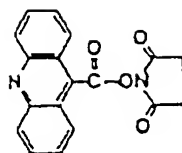
【 0 0 1 4 】

【 化 1 8 】

39



40

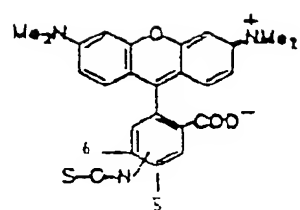


【0015】

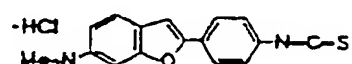
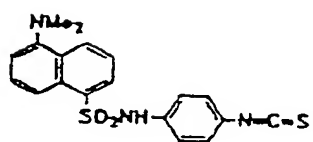
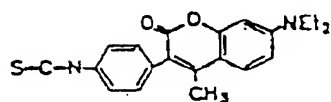
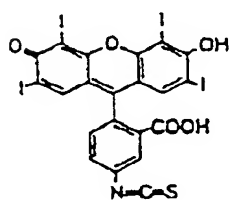
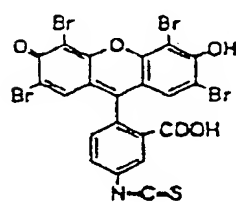
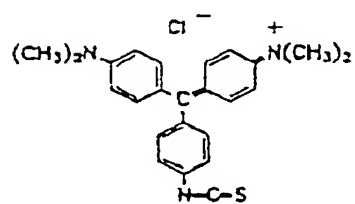
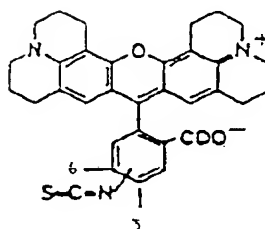
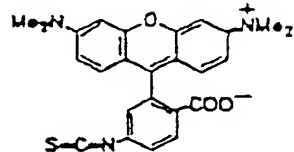
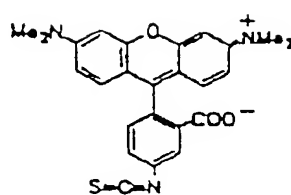
【化19】

40

41



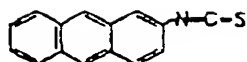
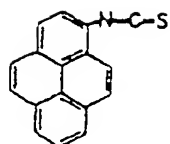
42



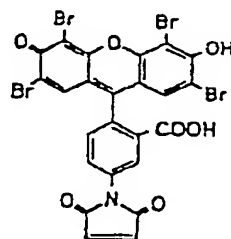
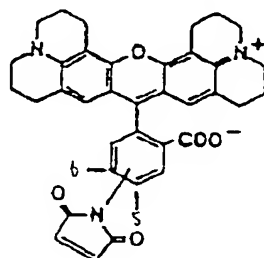
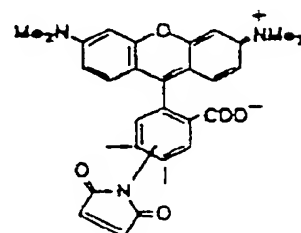
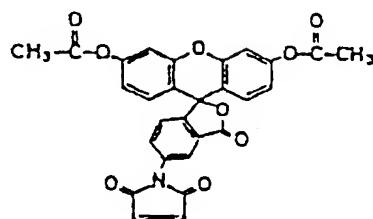
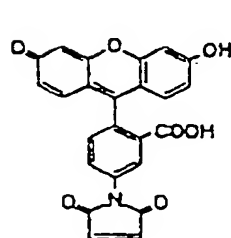
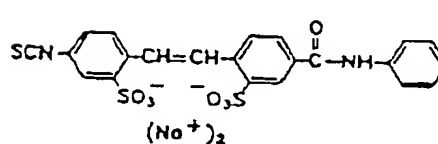
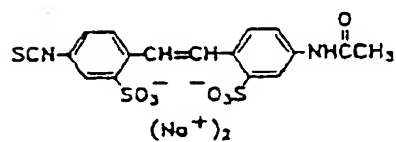
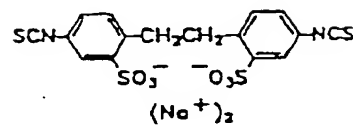
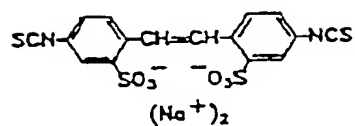
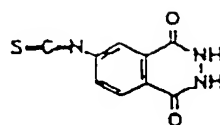
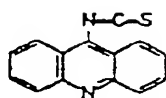
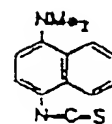
【0016】

【化20】

43



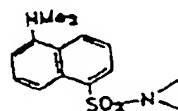
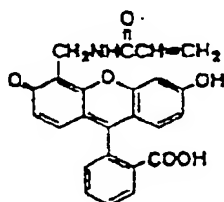
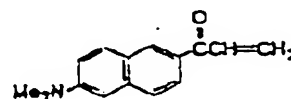
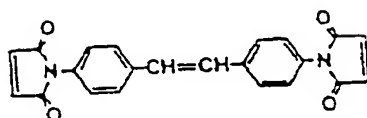
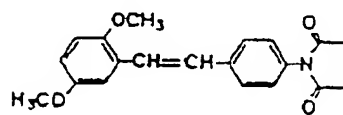
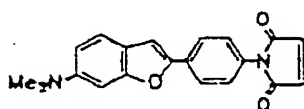
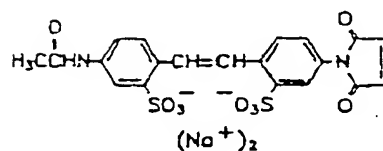
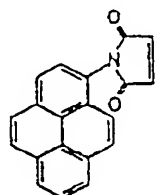
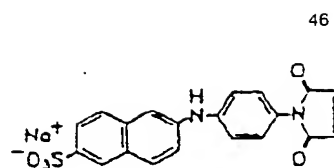
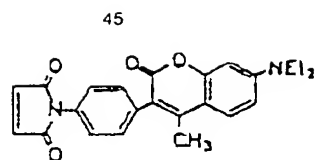
44



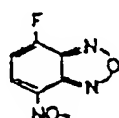
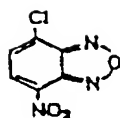
40

【0017】

【化21】

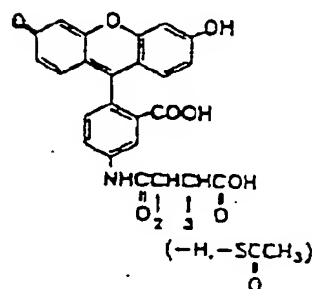
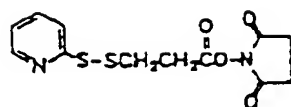
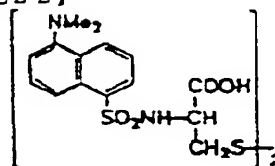


【0018】



30

【化22】

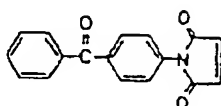
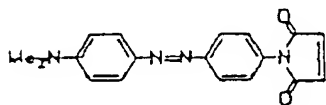


が挙げられる。

【0019】本発明に用いられる光ルミネセンスエネルギー移転のアクセプターとして好ましくは、光ルミネ

センスエネルギー移転のドナーに関しての上述の性質と、アクセプター自身が光ルミネセンス性を有している必要はないことを除いては同様の性質を有するものが好まし

い。それゆえ、ドナーとして上に挙げたようなクラスの化合物はアクセプターとしても用いることができる。これに加えて、アゾ色素類のような適当な波長を吸収する化合物もアクセプターとして用いることができる。特に好ましい化合物として上に挙げた化合物はアクセプター



【0021】も有用である。免疫反応の反応体は、免疫反応が生じた時にその内部の一对(intra-pair)の距離および方向が好ましいものとなる確率が最大となるようドナーあるいはアクセプターでラベルされなくてはならない。このことによって最適な結果が得られる。

【0022】図1は、本発明の典型的な具体例の概念図である。免疫反応がドナーであるフルオレセインイソチオシアネート(FITC)でラベルされている抗体とアクセプターであるエオシンイソチオシアネート(EOSIN)でラベルされている抗原の間で生じたことを示す。その結果、ドナーとアクセプターはエネルギーの移転(波線矢印で図中に示す)がドナーとアクセプターの間で生じるよう十分密に近接している。続いてドナーの光ルミネセンスの寿命の検出可能な変化となって現れる結果となり、これは所望によりラベルされた抗原の量に相関させることができる。同様にして、所望により抗体をアクセプターでラベルし、抗原をドナーでラベルしてもよい。これは図2に示されており、抗原T₄はドナーであるB-フィコエリトリン複合体(B-phycoerythrin conjugate)でラベルされ、抗体である抗-T₄ IgG (MAb)はアクセプターであるCY5でラベルされている。

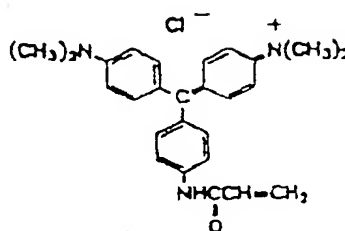
【0023】図3は、50MHzにおけるFITCでラベルした抗体の見かけの寿命あるいは位相角と、ラベルした抗原、エオシン-IgGの量の相関を示したグラフである。計測された位相角および誘導されたみかけの寿命は(アクセプターでラベルした)抗原の量の増加に従って減少している。

【0024】図4から図7は抗体としてヤギの抗マウス IgG (マウスのイムノグロブリンGを認識するようにヤギで作製した抗体)をドナーであるジクロロトリアジ

としても有用であり、これに加えて、エオシンイソチオシアネート、

【0020】

【化23】



20 ニルアミノフルオレセインでラベルしたもの("DTAF-GAMGG")を用い、抗原としてマウスの IgG にアクセプターであるテトラメチルローダミンイソチオシアネートでラベルしたもの("TRITC-MIGG")を用いて行った試験の結果を示す。

【0025】図4は、DTAF-GAMGG単独、およびこれをTRITC-MIGGと反応させた場合の位相角(および変調)と周波数の関係を示す。試料はHe/Cdレーザーで励起波長422nmにて励起した。発光波長は520nmとした。TRITC-MIGGのDTAF-GAMGGに対するモル比は0.38とした。

【0026】図5はレーザーを、ピリジン色素レーザーと同調ポンピングする連続波周波数2倍モード固定Nd:YAGレーザー(continuous wave frequency-doubled mode-locked Nd:YAG laser synch-pumping a pyridine 1 dye laser)で、その出力の周波数が2倍であり、380nmの励起波長の照射をするものを用いる以外は図4と同じ相関図である。

【0027】図6は図4及び5の反応における位相角と周波数の間の相関を示す。両方の波長に対して、位相角の変化は周波数の増加に従って増加している。

【0028】図7はピリジン1色素レーザーと同調ポンピングする連続波周波数2倍モード固定Nd:YAGレーザーの図示したような異なる周波数に変調した場合の位相角と抗原量の間の相関を示す。位相角は抗原量の増加に伴って減少する。

【0029】図8は図2の反応における位相角あるいは変調と周波数の間の相関を、異なるアクセプター濃度において、励起波長560nmのYAG/R6Gレーザーを用いて調べた相関図である。発光波長は580nmとした。

【0030】本発明の方法に用いるための好ましい機器の具体例のひとつの概念図を図9に示した。これにかぎられず、適当な機器を用いることができることは理解されるべきである。

【0031】図9に示したように、照射源10、この場合にはヘリウム-ネオンレーザーで照射波長543nmで、励起ビーム12を発光し、これは音響光学(acousto-optic)変調器14にて周波数 f_1 で正弦波様に変調された励起ビーム16を発するように調節される。変調器14は音響光学変調器である必要はなく、電気的変調器のような適当な変調器であればどれでも使用してよい。さらに、変調は正弦波型である必要もなく、どのような好ましい形状でもよい。また、変調器は外部に設置する必要はなく、かわりに、レーザーダイオードで可能なように、光源をもとから変調させてもよい。

【0032】正弦波型に変調された励起ビーム16は、ラベルした免疫反応の反応体を含む試料を照射する。この照射されたサンプルは発光ビーム18を発光し、これは光電子増倍管(photomultiplier tube)20で検出される。この代わりに、アバランシュ型(avalanche)光ダイオードを検出器として、特に赤外線の出検に用いてもよい。発光されたビーム18は増幅され、励起光と同じ周波数に変調されるが、励起光に対して位相はシフトし、そして励起光に応じて復調される。発光ビーム18を光学フィルターFのフィルターを通して検出器の効率的な感受性域に変化させても良い。

【0033】相互相関回路(cross-correlation circuit)22には音響光学変調器14を駆動するために変調周波数 f_M の半分の周波数 f_1 を生み出す第1周波数シンセサイザー24を含む。相互相関回路22にはまた光り倍率器管20を駆動するために、変調周波数 f_M に相互相関周波数 Δf を加えた周波数と等しい周波数 f_2 を生じさせる第2周波数シンセサイザー26も含まれる。第1周波数シンセサイザー24は周波数2倍器28と一対をなし、これは変調周波数 f_M と等しい周波数を有するシグナルをミキサー30へ向ける。第2周波数シンセサイザー26もまた、変調周波数 f_M に相互相関周波数 Δf を加えたものに等しい周波数 f_2 を有するシグナルをミキサー30へ向ける。ミキサー30は、 f_M と f_2 の差である Δf に等しい周波数のシグナルを出力する。

【0034】ミキサー30および光電子増倍管20はそ

れぞれ位相計/デジタル式電圧計32に接続されている。位相計/デジタル式電圧計32は Δf の周波数を有するミキサー30より得られるシグナルと Δf (シフトしている)の周波数を有する光倍率器管20から得られるシグナルを比較して位相シフト ϕ および変調要因 m を計算する。位相シフト ϕ および変調要因 m はその後コンピューター34にかけられる。上記解説は説明のためだけであり、これに限定されるものではない。添付の請求の範囲により規定される発明の範囲内での修飾も本発明の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の好ましい具体例のひとつに関する免疫反応の概念図である。

【図2】 本発明の好ましい具体例のひとつに関する免疫反応の概念図である。

【図3】 図1の免疫反応のひとつの抗原の量に対する見かけ上の寿命あるいは位相角の相関を示すグラフである。

【図4】 本発明の他の好ましい具体例の免疫反応における周波数に対する位相角あるいは変調の相関を示すグラフである。

【図5】 図4と同じ免疫反応において、異なった励起波長を用いた場合の周波数に対する位相角あるいは変調の相関を示すグラフである。

【図6】 図3及び図4の励起波長における周波数に対する位相角の相関を示すグラフである。

【図7】 図4の免疫反応に対して異なる周波数における抗原の量に対する位相角の相関を示すグラフである。

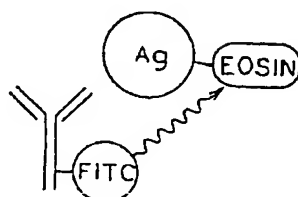
【図8】 図2に示した免疫反応において、周波数に対する免疫反応時の位相角の変化および変調を示すグラフである。

【図9】 本発明の好ましい具体例を実施するために使用する機器の概念図である。

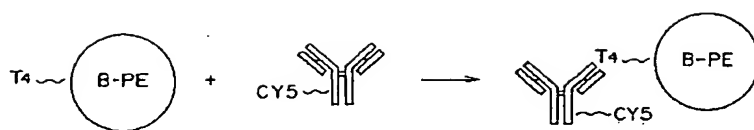
【符号の説明】

10：ヘリウム-ネオンレーザー、12：励起ビーム、14：音響光学変調器、16：励起ビーム、18：発光ビーム、20：光電子増倍管、22：相互相関回路、24、26周波数シンセサイザー、28：周波数2倍器、30：ミキサー、32：位相計/デジタル電圧計、34：コンピューター

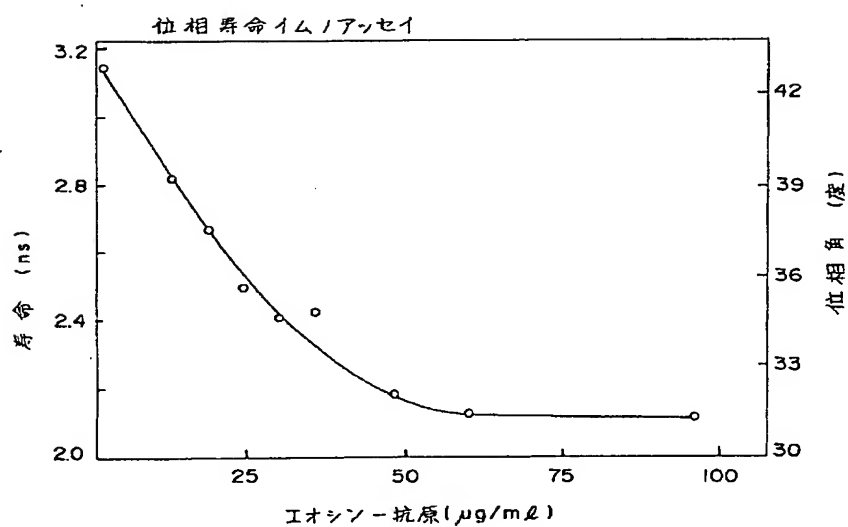
【図1】



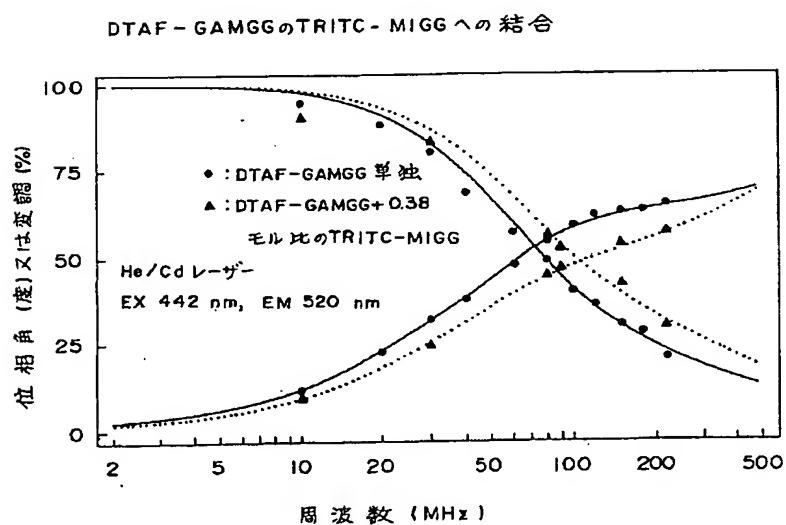
【図2】



【図3】

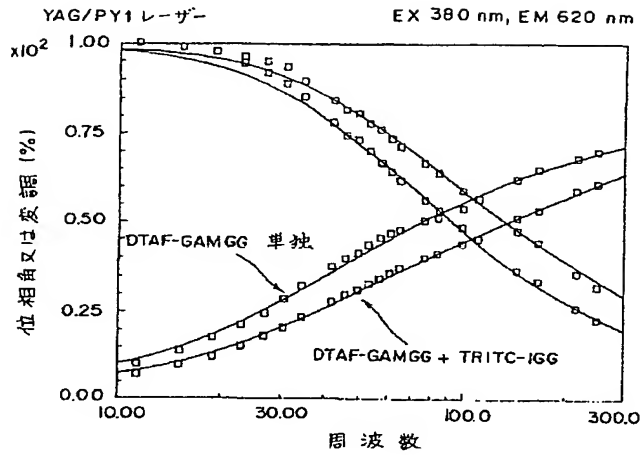


【図4】



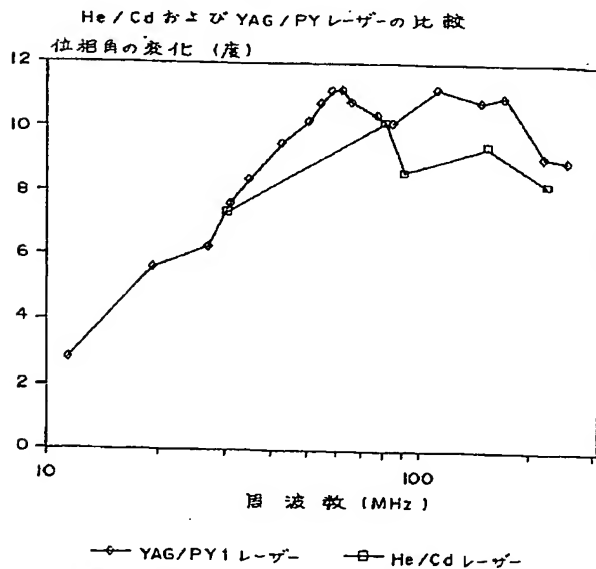
【図5】

DTAF-GAMGGと0.38モル比の
TRITC-MIGGとの結合



【図6】

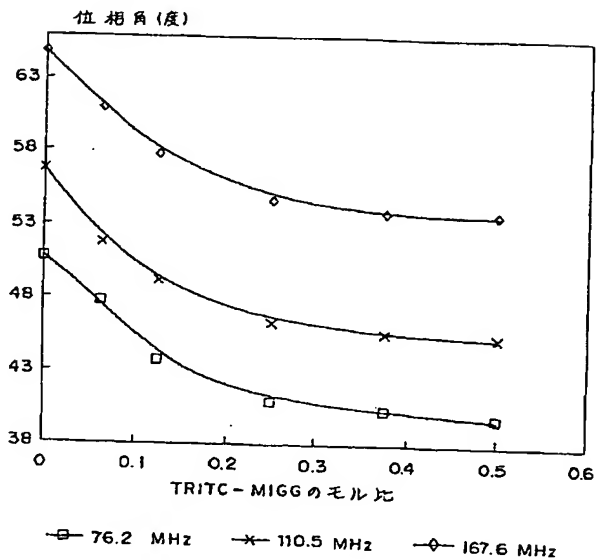
DTAF-GAMGGと0.38モル比の
TRITC-MIGGとの結合



測定は0.38モル比のTRITC-MIGGの
添加の前後を行った。
YAG/PY1: EX 380 nm, He/Cd: EX 442 nm, EM 520 nm

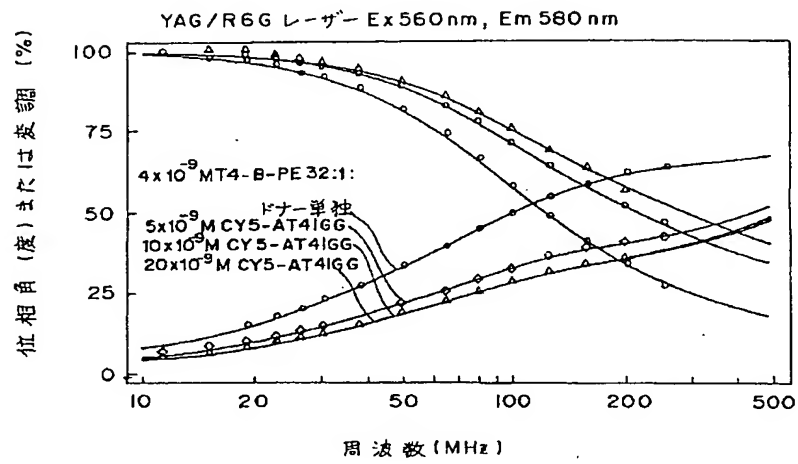
【図7】

YAG/PY1レーザーを用い、異なった周波数に
かけるDTAF-GAMGGのTRITC-MIGGへの結合

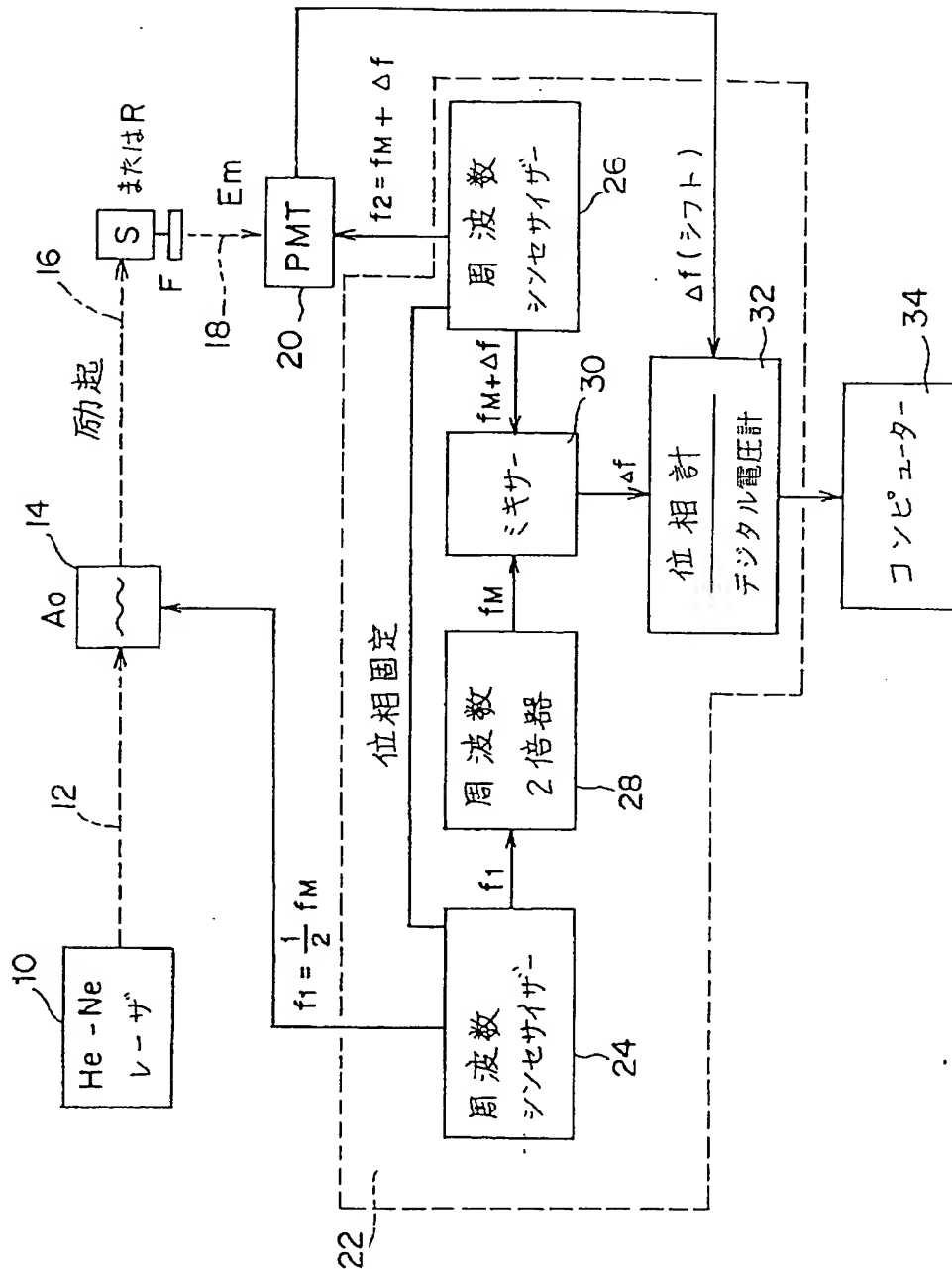


YAG/PY1レーザー
EX 380 nm, EM 520 nm

【図8】

CY5-AT41GG の存在下におけるT4-B-PE 32:1 (4×10^{-9} M)

【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 バドリ・ビー・マリワル
アメリカ合衆国21218メリーランド州バル
ティモア、ガイルフォード・アベニュー
2831番 ナンバー2

(72)発明者 リチャード・トンプソン
アメリカ合衆国21212メリーランド州バル
ティモア、ブリストル・ロード7106番

(72)発明者 アルビダス・オジンスカス
アメリカ合衆国21036メリーランド州デイトン、セントーラス・コート5002番

